

tumefaciens LB4404(Hoekema et al., 1983(参考文献(12)))およびEHA101(Qhodet al., 1986(参考文献(5)))を好ましく用いることができる。

(0018)本発明の方法によれば、アグロバクテリウム属細菌における病原性(vir)領域の遺伝子群の発現に基づき遺伝子導入系であれば、特に限定されることなく有害な効果を得ることができ、したがって、上述の中間ベクター、バイナリーベクター、複製陽性のバイナリーベクター、スーパーバイナリーベクターなどいずれのベクターシステムに対しても用いることができ、本発明による効果を得ることができ、これらのベクター類を改良した質的なベクターシステムを用いた場合には、同様に効果を得ることができる(例えば、アグロバクテリウム属細菌のvir領域の一部または全部を切り出し付加的にプラスミド中に組み込む、vir領域の一部または全部を切り出し新たなプラスミドの一部としてアグロバクテリウムに導入するなど)。また、当然ではあるが本発明の方法によれば、野生型のアグロバクテリウム属細菌においても、植物へ野生型T-DNA領域の導入効率を高め、事実上感染効率を上昇させることができる。

(0020)植物に導入しようとする所望の遺伝子は、上記プラスミドのT-DNA領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、当該プラスミドに同時に若しくは別添担込んだカマイン、パロモイシン等の薬剤に対する耐性を有する遺伝子等の選択マーカー遺伝子と組み込むことができる。大抵多数の制限部位を有するT-DNA領域に導入することは、三系交雑法による場合よりも容易である。この場合には、三系交雑法による場合よりも、アグロバクテリウム属細菌の細胞内での相同組換えを利用することで目的DNAを導入することができる。

(0021)また、プラスミドをAgrobacterium tumefaciens等のアグロバクテリウム属細菌に導入する操作は従来法により行うことができ、例としては、上記した三系交雑法をエレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、Pcなどの化学的な処理による方法などが含まれる。

(0022)植物に導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様に基本的にT-DNAの左右境界配列の間に配置されるものである。しかし、プラスミドが環状であるため、境界配列の数は1つでもよく、複製の遺伝子を有する部位に配置しようとする場合には、境界配列が環状以上であってもよい。また、アグロバクテリウム属細菌中で、T-DNAはRプラスミド上に配置されてもよく、または他のプラスミド上に配置されてもよい。さらには、複製の境界のプラスミド上に配置されてもよい。

(0023)アグロバクテリウム属細菌を介して遺伝子導入を行う方法は、植物細胞又は植物組織をアグロバクテリウム属細菌と単に接触させることにより行うことができる。例えば、 $10^4 \sim 10^6$ 細胞/ml程度の細胞

(2)、特開昭60-70080号(EPT203516)などがあり、これらをもとに数多くの新たなバイナリーベクターが構築され、形質転換に用いられている。また、R1プラスミドのシステムにおいても、同様なベクターが構築され形質転換に用いられている。

(0016)アグロバクテリウム属細菌(Shimoda et al., 1995(参考文献(39)))は、強病原性(super-virulent)の菌系であり、その宿主範囲は広く、形質転換効率も他の菌系より高い(Hood et al., 1987(参考文献(13))); Komari, 1989(参考文献(21))。この特性は、A28が有するTプラスミドのpT180542によるものである(Hood et al., 1984(参考文献(16))); Jin et al., 1987(参考文献(20)); Komari et al., 1986(参考文献(44))。

(0017)pT180542を用いて、これまで2つの新しいシステムが開発されている。一つはpT180542のA28アーム型のTプラスミドを有する菌株EHA101(Hood et al., 1986)およびEHA105(Hood et al., 1993)を用いたものであり、これらを上記のバイナリーベクターシステムに適用することにより、形質転換能力の高いシステムとして種々の植物の形質転換に利用されている。もう一つは、スーパーバイナリーベクター(super-binary vector)(Niet et al., 1994(参考文献(11))); Ishida et al., 1996(参考文献(18)); Komari et al., 1999(参考文献(25))。W94/0097号、W95/06722号のシステムである(図4)。このシステムは、vir領域(virA, virB, virC, virD, virE及びvirG)以下、これらをそれぞれ「vir断片領域」といふこととある。)を持つディーズアーム型のTプラスミドおよびT-DNAを有するプラスミドからなることから、バイナリーベクターシステムの一つである。しかしながら、T-DNAを有する側のプラスミド、即ちバイナリーベクターにvir断片領域のうち、少なくとも一つのvir断片領域を実質的に取り除いたvir断片領域(このうち好ましくは少なくともvirB又はvirCを含む断片、さらに好ましくはvirE及びvirGを含む断片)を組み込んだ(Komari, 1990a(参考文献(22)))スーパーバイナリーベクターを用いる点で異なる。なお、スーパーバイナリーベクターを有するアグロバクテリウムに、所望の遺伝子を組み込んだT-DNA領域を導入するには、三系交雑法を介した相同組換えが有効な手法として利用できる(Komari et al., 1996(参考文献(23)))。このスーパーバイナリーベクターシステムは、上述の種々のベクターシステムと比べて、多くの植物種で非常に高い形質転換効率をもたらすことが明らかとなっている(Niet et al., 1994(参考文献(11))); Ishida et al., 1996(参考文献(18)); Komari, 1990a(参考文献(22)); Li et al., 1996(参考文献(27)); Saito et al., 1992(参考文献(35))。

(0018)本発明の方法においては、宿主となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、Agrobacterium tumefaciens (例えば上述のAgrobacter

ミド上のヴィレルレンス領域(vir領域)に存在する遺伝子群が必要であり、またT-DNAが切り出されるためにはT-DNAの両端に存在するターゲター配列が必要である。他のアグロバクテリウム属細菌であるAgrobacterium rhizogenesもR1プラスミドによる同様なシステムを有している(図3及び図4)。

(0014)アグロバクテリウム属細菌によってT-DNAが植物ゲノムに組み込まれるので、T-DNA上に所望の遺伝子を挿入することの遺伝子も植物ゲノムに組み込まれることが期待された。しかしながら、Tプラスミドは190kb以上と巨大であるため、標準的な遺伝子工学手法ではプラスミド上のT-DNA上に遺伝子を挿入することは困難であった。そのため、T-DNA上に外基遺伝子を挿入するための方法が開発された。

(0015)まず、感染性のTプラスミドのT-DNAからホルモン合成遺伝子が除去されたディーズアーム型の菌系(disarmed strains)であるLB4404(Hoekema et al., 1983(参考文献(12)))、CS8C(pCX3550)(Zamborski et al., 1983(参考文献(12)))、OJ371152(Fraley et al., 1985(参考文献(9)))などが作製された(図3)。これらを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリウムのTプラスミドT-DNA中に、あるいは所望の遺伝子を有するT-DNAをアグロバクテリウムに導入する操作の方法が開発された。このうちの一つは、遺伝子操作が容易で所望の遺伝子の挿入が可能であり、大規模で複製ができる中間ベクターを、アグロバクテリウムのディーズアーム型TプラスミドT-DNA領域中、三系交雑法(tri-parental mating)(Ditta et al., 1980(参考文献(8)))を介して相同組換えにより導入する方法であり、中間ベクター法と呼ばれる(Fraley et al., 1985(参考文献(9))); Fraley et al., 1983(参考文献(10)); Zamborski et al., 1983(参考文献(40))。特開昭59-14085号(EPT16718)。もう一つは、バイナリーベクター(binary vector)法とよばれるもので(図3)、T-DNAの植物への組み込みにはvir領域が必要であるが、簡便するために同じプラスミド上に存在する必要はないという結果(Hoekema et al., 1983)に基づいている。このvir領域にはvirA, virB, virC, virD, virE及びvirGが存在し、(植物バイオテクノロジー事典(エンタプライズ株式会社発行(1989)))、vir領域とはこのvirA, virB, virC, virD, virE及びvirGの全てを含むものをいう。したがって、バイナリーベクターは、T-DNAをアグロバクテリウムと大腸菌の両方で複製可能な小さなプラスミドに組み込んだものであり、これをディーズアーム型Tプラスミドを有するアグロバクテリウムに導入して用いる。アグロバクテリウムへのバイナリーベクターの導入には、エレクトロポレーション法や三系交雑法などの方法により行うことができる。バイナリーベクターには、pBR19(Bevan, 1984(参考文献(4)))、pBR121(Jefferson, 1987(参考文献(19)))、pC442(An et al., 1988(参考文献

菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供する。

(0009)

[発明の実施の形態]本発明の方法では、アグロバクテリウム属細菌を介した遺伝子導入方法において、遺伝子導入する植物細胞又は植物組織を遺伝子導入することをする。植物細胞又は植物組織は、遺伝子導入後、通常は、遺伝子導入後、アグロバクテリウム属細菌と接触させるとよく、好ましくは、植物細胞又は植物組織を遺伝子導入後、通常の重力下でアグロバクテリウム属細菌と接触させる方法である。

(0010)遺伝子導入条件は、用いる植物の種類に応じて適宜選択されるが、通常、 $100G \sim 250G$ 、好ましくは $500G \sim 2000G$ 、さらに好ましくは $1000G \sim 1500G$ 程度の遠心加速度範囲で行われる。また、遺伝子導入時間は、遠心加速度及び用いる植物の種類等に応じて適宜選択されるが、通常1秒間以上かつ通常10分間程度以下である。遠心時間の上限は特にないが、通常、 1.0 分間程度以下である。

(0011)本発明の方法は、アグロバクテリウム属細菌と接触させる植物細胞又は植物組織として遺伝子導入する方法を用いる。又は遠心処理を行いつつアグロバクテリウム属細菌と接触させることを特徴とするものである。アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入あるいは形質転換方法自体としては、周知の方法をそのまま適用することができる。

(0012)アグロバクテリウム属細菌を用いた植物への遺伝子導入あるいは形質転換方法は、この分野において周知であり、広く用いられている。

(0013)土壌細菌アグロバクテリウム(Agrobacterium tumefaciens)が多くの双子葉植物に根癌腫瘍(crown gall disease)を引き起こすことは古くから知られており、1970年代には、Tプラスミドが病原性に関与すること、さらにTプラスミドの一部であるT-DNAが植物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後このT-DNAは癌腫の誘発に必要不可欠なホルモン(サイトカイニンとオーキシン)の合成に関与する遺伝子が存在し、細菌遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかになった。T-DNAの切り出しと植物への伝達にはTプラス

なお、スーパバイナリーベクターに匹敵する、か、それ以上の遺伝子導入効率を得ることができる。また、スーパバイナリーベクターと遠心処理法を用いることにより、より一層効率を向上させることが可能である。さらに、遠心処理法を用いることにより、これまで

で全く形質転換体を得ることができなかった品種においても形質転換体を得ることができると推察される。【表1】表1 各種遠心処理と共存培養後のQ5発現結果 (供試菌株: LB4404/pS8133)

各菌株	培養条件 (G/L/ml)	無処理	遠心処理後	
			760 g	8,500 g
コシヒカリ	1 × 10 ⁶	3/10 (-)	8/10 (+)	7/10 (++)
	1 × 10 ⁶	3/10 (-)	8/10 (+)	7/10 (++)
	1 × 10 ⁶	4/10 (+)	3/10 (-)	9/10 (++)
月の光	1 × 10 ⁶	1/10 (-)	8/10 (+)	7/10 (++)
	1 × 10 ⁶	1/10 (-)	8/10 (+)	7/10 (++)

遠心処理時間: 10分, 共存培養期間: 3~5日, Q5発現性 ※【0042】

未熟胚数/供試未熟胚数 【表2】表2 コシヒカリ未熟胚からのパロモマシニン耐性カルスの出現率 (供試菌株: LB4404/pS8133)

()内は胚数におけるQ5発現領域の面積 - :なし, + : 小, ++:中, +++:大 ※

各菌株	培養条件 (G/L/ml)	無処理	遠心処理後	
			760 g	8,500 g
コシヒカリ	1 × 10 ⁶	4.8% (1/21)	0.0% (0/22)	15.0% (3/20)
	1 × 10 ⁶	4.3% (1/23)	4.5% (1/22)	16.7% (3/18)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/21)	0.0% (0/22)	14.3% (3/21)
月の光	1 × 10 ⁶	0.0% (0/23)	0.0% (0/21)	0.0% (0/18)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/22)	0.0% (0/21)	0.0% (0/22)

耐性カルスの出現した未熟胚数/供試未熟胚数, 2次選 ★【0043】

最終了時調査 【表3】表3 月の光未熟胚からのパロモマシニン耐性カルスの出現率 (供試菌株: LB4404/pS8133)

各菌株	培養条件 (G/L/ml)	無処理	遠心処理後	
			760 g	8,500 g
コシヒカリ	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	0.0% (0/11)	30.0% (3/10)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	9.1% (1/11)	27.3% (3/11)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/10)	0.0% (0/13)	8.1% (1/11)
月の光	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	0.0% (0/11)	0.0% (0/11)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	0.0% (0/11)	45.5% (5/11)

耐性カルスの出現した未熟胚数/供試未熟胚数, 2次選 ☆【0044】

最終了時調査 【表4】表4 遠心処理時間と共存培養後のQ5発現結果 遠心処理時間: 10分, 共存培養期間: 3~5日 ☆ (品種: コシヒカリ)

各菌株	培養条件 (G/L/ml)	無処理	遠心処理時間	
			10分	30分
コシヒカリ	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	8/10 (++)	10/10 (+++)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	10/10 (++)	10/10 (++)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	10/10 (++)	10/10 (++)

遠心処理時間: 10分, 共存培養期間: 3~5日 ☆ (品種: コシヒカリ)

未熟胚数/供試未熟胚数 【表5】表5 遠心処理時間とパロモマシニン耐性カルスの出現率 (品種: コシヒカリ)

()内は胚数におけるQ5発現領域の面積 - :なし, + : 小, ++:中, +++:大 ※

各菌株	培養条件 (G/L/ml)	無処理	遠心処理時間	
			10分	30分
コシヒカリ	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)
月の光	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)

遠心処理時間: 10分, 共存培養期間: 3~5日, 2次選後 ※【0046】

未熟胚数/供試未熟胚数 【表6】表6 遠心処理時間と共存培養後のQ5発現結果 遠心処理時間: 10分, 共存培養期間: 3~5日 ☆ (品種: コシヒカリ)

()内は胚数におけるQ5発現領域の面積 - :なし, + : 小, ++:中, +++:大 ※

各菌株	培養条件 (G/L/ml)	無処理	遠心処理時間	
			10分	30分
コシヒカリ	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)
月の光	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)

耐性カルスの出現した未熟胚数/供試未熟胚数, 2次選 ☆【0047】

最終了時調査 【表7】表7 遠心処理時間と共存培養後のQ5発現結果 遠心処理時間: 10分, 共存培養期間: 3~5日 ☆ (品種: コシヒカリ)

()内は胚数におけるQ5発現領域の面積 - :なし, + : 小, ++:中, +++:大 ※

各菌株	培養条件 (G/L/ml)	無処理	遠心処理時間	
			10分	30分
コシヒカリ	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)
月の光	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)
	1 × 10 ⁶	0.0% (0/11)	34.3% (12/35)	33.0% (14/40)

各種選心 処理	各種選心 期間	未熟胚数		
		胚型におけるQIS発現頻度		
		-	±	+
無処理	3日間	5	4	1
	6日間	0	6	2
	13日間	0	5	2
2000 "	3日間	0	2	6
	6日間	0	1	3
	13日間	0	1	3
4000 "	3日間	0	1	7
	6日間	0	0	6
	13日間	0	1	5

供試図系：LB4404/p(GI211h) 1) 液量高速選心機 2) ※ +: 1/8-1/4, ++: > 1/4
大型高速選心機 [0048]

それそれの回転数に対し、60分間の選心処理
胚細胞に占めるQIS発現領域の割合 - なし, ±: < 1/8, ※20 後のQIS発現(品種: コシヒカリ)

各種選心 処理	各種選心 期間	未熟胚数		
		胚型におけるQIS発現頻度		
		-	±	+
無処理	3日間	7	3	0
	6日間	3	1	0
	13日間	1	0	2
2000 "	3日間	0	0	1
	6日間	0	0	2
	13日間	0	0	1
4000 "	3日間	1	0	4
	6日間	0	0	0
	13日間	0	0	1

供試図系：LB4404/p(GI211h) 1) 液量高速選心機 2) ※ +: 1/8-1/4, ++: > 1/4
大型高速選心機 [0049]

それそれの回転数に対し、60分間の選心処理
胚細胞に占めるQIS発現領域の割合 - なし, ±: < 1/8, ※40 種の月(光)

各種選心 処理	供試本数	胚化数	QIS発現数	形質転換効率
無処理	50	17	12	24.0%
選心処理	150	60	54	36.0%

選心処理: 200G・60分 共存培養5日間
[0050]

[表10] LB4404(pGI211h)による形質転換結
果(品種: 月の光)

各種選心 処理	供試本数	胚化数	QIS発現数	形質転換効率
無処理	40	9	3	7.5%
選心処理	47	10	5	10.6%

選心処理: 200G・60分 共存培養5日間
[0051]

* [表11] LB4404(pGI211h)による形質転換結
果(品種: コシヒカリ)

各種選心 処理	供試本数	胚化数	QIS発現数	形質転換効率
無処理	40	4	2	4.1%
選心処理	274	35	27	9.9%

選心処理: 200G・60分 共存培養5日間
[0052]

* [表12] LB4404(pS8131)による形質転換結
果(品種: コシヒカリ)

各種選心 処理	供試本数	胚化数	QIS発現数	形質転換効率
無処理	63	0	-	0.0%
選心処理	261	30	23	8.2%

選心処理: 200G・60分 共存培養3日間

[0053] 実施例2

大きさは約1.2 mmのトウモロコシ未熟胚(品種A188、農林
水産省生物資源研究所より入手)を無菌的に取り出し、
LS-in液体培地で一回洗浄した。選心管に未熟胚と100
μMのアセトシンゴンを含むLS-in培地2.0 mlに約1
x 10⁶ cfu/mlの温度、Aerobacterium tumefaciens LB
A4404(pS8131) (Ishida et al., 1996(参考文献(18)))
を懸濁した液を加え、40,000G、4℃で30分間選心処理し
た。対照の未熟胚は、前記と同様の細胞懸濁液中で30分
間、室温で静置した。処理後、緩やかに攪拌した後、胚
軸面が培地に接するようにLS-AS培地に置いた。ま
た、無菌的に取り出した未熟胚をLS-in液体培地で一回
洗浄した後、同液体培地を含む選心管に移し、20 10℃ま
たは40 10℃で4℃、30分間の選心処理を行った。対照は液
体培地中で3日間、室温で静置した。処理後、液体培地
を除き、約1 x 10⁶ cfu/mlの温度でLB4404(pS8131)を
懸濁した液を加え、緩やかに攪拌した。5分間室温で静
置した後、胚軸面が培地に接するように10 μM AgNO₃
を含むLS-AS培地に置いた。25℃、暗黒下で3日間共存
培養した後、一部の未熟胚を採取し、実施例1と同様に
x-glucによりQIS遺伝子のトランジェントな発現を観査

した。なお、上記の培地および培養法は、Ishida, Y. et
al., 1996(参考文献(18))に記載の方法に従った。
[0054] LB4404(pS8131)を接種したA188未熟胚で
のQIS遺伝子のトランジェントな発現を表13に示す。
いずれの未熟胚もQIS遺伝子の発現を示したが、対照の
未熟胚に比べ、選心処理を行った未熟胚では、より広い
範囲での発現を示すものが多いと認められた。選心処理に
よる遺伝子導入部位の増大は、アグロバクテリウム菌と
ともに選心処理を行った場合、選心処理後アグロバクテ
リウム菌を接種した場合の両方で認められた。また、選
心強度及び処理時間を変えた場合でも対照に比べより広
い範囲でのQIS遺伝子の発現が認められた。
[0055] 以上の結果から、選心処理した未熟胚を選
抜培地で培養すれば、対照に比べより高い効率で、形質
転換植物の得られる可能性が示された。また、従来のア
グロバクテリウム法では形質転換できなかったA188以外
のトウモロコシ品種 (Ishida et al., 1996(参考文献(1
8))) についても選心処理することにより形質転換植物
の得られる可能性が示唆された。
[0056]

[表13] 表13 A188未熟胚でのQIS遺伝子のト
ランジェントな発現

試験 回数	処理 内容	染色体伝子の発現			
		+++	++	+	-
1	40 30 20 10 5 対照	7	10	10	0
2	40 30 20 10 5 対照	1	17	12	0
3	40 30 20 10 5 対照	0	3	17	0
4	40 30 20 10 5 対照	0	10	10	0
5	40 30 20 10 5 対照	0	1	19	0

参照は1 Gでの処理。試験はアグロバクテリウム感染条件下で遺伝子導入を行った。試験2は遺伝子導入後、アグロバクテリウム菌の接種を行った。

【0057】本発明により、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で、組織を付与することなく簡単に遺伝子導入を行うことができる。植物組織への遺伝子導入の効率を向上させる方法が提供された。本発明の方法は、単子葉植物に対しても双子葉植物に対しても適用可能である。

【0058】参考文献

- (1) Alcantara RR, Hodges TK (1996) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617
- (2) An, G., Evert, P.R., Nitira, A. and Ha, S.B. (1989) Binary vectors. In: Galvin, S.B. and Schilperoort, R.A. (eds.), *Plant Molecular Biology Manual A* 3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19.
- (3) An, G., Watson, B.D., Stachel, S., Gordon, M.P. & Nester, E.R. (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* 4:277-288.
- (4) Bevan, M. (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12, 8711-8721.
- (5) Bidney, D., Scelone, C., Martich, J., Burns, M., Sims, L., and Huffman G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Mol. Biol.* 18, 301-313.
- (6) Chilton, M.-D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P. & Nester E.R. (1974) Agrobacterium tumefaciens DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:3672-3676
- (7) Chu, C. (1978) *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*, Science Press Peking, pp.43-50
- (8) Datta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D.R. (1980) Broadhost range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7347-7351.

- (9) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eichholtz, D.A. and Flick, J.S. (1985) The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector for plant transformation. *Bio/Technology*, 3, 629-635.
- (10) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Britner, M., L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells (1983) *Expression of bacterial genes in plant cells*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 4803-4807.
- (11) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6, 271-282.
- (12) Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., and Schilperoort, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180.
- (13) Hood, E.E., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1987) Virulence of Agrobacterium tumefaciens strains in A281 on lemons. *Plant Physiol*, 83, 529-534.
- (14) Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993) New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* 2, 208-218.
- (15) Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1986) The hypervirulence of Agrobacterium tumefaciens A281 is encoded in a region of pTi80542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168, 1291-1301.
- (16) Hood, E.E., Jen, G., Kayes, L., Kramer, J., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1984) Restriction endonuclease map of pTi80542, a potential Ti-plasmid vector for genetic engineering of plants. *Bio/Technology*, 2, 702-709.
- (17) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985) USA, 77, 7347-7351.

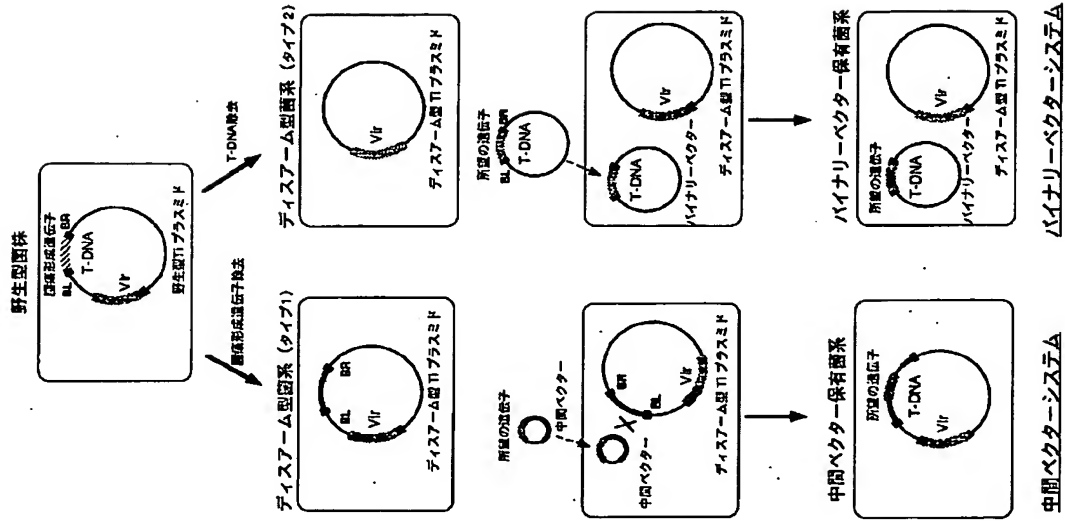
- A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.
- (18) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Nature Biotechnology*, 14, 745-750.
- (19) Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Rep.* 5, 387-405.
- (20) Jin, S., Komari, T., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1987) Genes responsible for the hypersensitive phenotype of Agrobacterium tumefaciens A281. *J. Bacteriol.* 169, 4417-4425.
- (21) Komari, T. (1989) Transformation of callus cultures of nine plant species mediated by Agrobacterium. *Plant Sci.* 60, 223-229.
- (22) Komari, T. (1990a) Genetic characterization of double-flowered tobacco plant obtained in a transformation experiment. *Theor. Appl. Genet.* 80, 167-171.
- (23) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured cells of *Oryzodindumina* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTi80542. *Plant Cell Reports*, 9, 303-306.
- (24) Komari, T., Halperin, W. and Nester, E.W. (1984) Physical and functional map of superinfectant Agrobacterium tumefaciens tumor-inducing plasmid pTi80542. *J. Bacteriol.* 166, 88-94.
- (25) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separate T-DNA for co-transformation of higher plants mediated by Agrobacterium tumefaciens and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.* 10, 165-174.
- (26) Komari, T. and Kubo, T. (1999) Methods of Genetic Transformation: Agrobacterium tumefaciens. In: Vasil, I.K. (ed.) *Molecular Improvement of Cereals*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 43-82.
- (27) Li, H.-Q., Sauter, C., Potrykus, I. and Puumäti-Kaerlas, J. (1996) Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology* 14, 736-740.
- (28) Lindsey, K., Gallois, P. and Eady, C. (1991) Regeneration and transformation of sugarcane by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Tissue Culture Manual* 87:1-13. Kluwer Academic Publishers.
- (29) McCormick, S. (1991) Transformation of tomato with Agrobacterium tumefaciens. *Plant Tissue Culture*

- Manual 86:1-9. Kluwer Academic Publishers.
- (30) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant* 15:473-497.
- (31) Ohira, K., Ojima, K., Fujikawa, A. (1973) Studies on the nutritional rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* 14:1113-1121.
- (32) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Nakanura, K. (1990) Construction and expression in tobacco of aβ-glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31: 805-813.
- (33) Potrykus, T., Biliang, R., Fütterer, J., Sauter, C. and Schrott, M. (1988) *Agricultural Biotechnology*, Marcel Dekker Inc. pp. 119-159.
- (34) Rogers, S.G., Horsch, R.B. and Fraley, R. T. (1988) Gene transfer in plants: Production of transformed plants using Ti plasmid vectors. *Method for Plant Molecular Biology*, CA: Academic Press Inc. pp.423-436.
- (35) Saito, Y., Komari, T., Masura, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. and Takamami, Y. (1993) Cucumber mosaic virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. *Theor. Appl. Genet.* 83, 679-683.
- (36) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) *Plant Sci.* 41:179-183
- (37) Trick, H.N. and Finer, J.J. (1997) SAAT: sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation. *Transgenic Research* 6:329-336.
- (38) Visser, R.G.F. (1991) Regeneration and transformation of potato by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Tissue Culture Manual* 85:1-9. Kluwer Academic Publishers.
- (39) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.-D. and Nester E.W. (1975) Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. *J. Bacteriol.* 123, 255-264.
- (40) Zambryski, P., Jous, H., Genetello, C., Lesma, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.

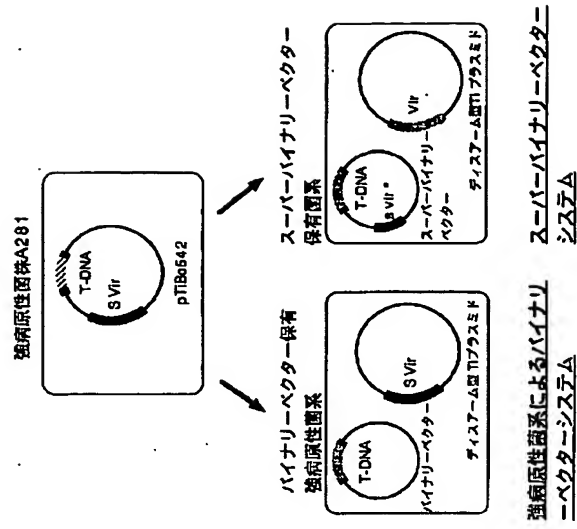
(図面の簡単な説明)

- (図1) 本発明の方法に好ましく用いることができるスーパーバイナリーベクターの例であるpUC23の構成法を示す図である。
- (図2) 本発明の方法に好ましく用いることができるスーパーバイナリーベクターの例であるpS813の遺伝子地図を示す図である。

【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 石田 祐二
静岡県静岡市駿河区東700番地 日本たばこ産業株式会社遺伝子研究所内

Fターム(参考) 28030 A002 A803 A020 C006 C017
C019 C002 C003 C007 C009
C013 C017
4B024 A020 B012 C004 D001 E010
F010 G017 G023 H020
4B005 A013X A089X A001 A803
A010 B023 B030 C031 C060